Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 4, Oct.-Nov. 2023, p. 557-575

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲ ص. ۵۷۵-۵۵۷

Research Article
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

The Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* from Motal Cheese on the Adhesion of *Cronobacter sakazakii* to Epithelial Cells

S.S. Fatemizadeh[1], M.B. Habibi Najafi[2*], D.S. Nielsen[3]

Received: 2022.07.31
Revised: 2022.10.02
Accepted: 2022.11.23
Available Online: 2022.11.27

How to cite this article:
Fatemizadeh, S.S., Habibi Najafi, M.B., & Nielsen, D.S. (2023). The effect of *Lactiplantibacillus plantarum* from Motal cheese on the adhesion of *Cronobacter sakazakii* to epithelial cells. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 19*(4), 557-575. (In Persian with English abstract).
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78002.1193

Introduction

Cronobacter sakazakii is an opportunistic pathogen, which has been linked to the contamination of powdered infant formula, and associated with outbreaks leading to fatalities in neonatal intensive care units. Few studies have explored the direct interaction between probiotics and *C. sakazakii*. In this study, the effect of a *Lactiplantibacillus plantarum* strain (M17) along with the standard strain *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) and the well-characterized probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG on the adhesion of *C. sakazakii* to intestinal epithelial cells was analyzed.

Materials and Methods

Acid and bile tolerance of M17 was evaluated in the presence of pepsin and pancreatin. L-arginine hydrolysis was investigated using an arginine-including medium. Auto-aggregation and co-aggregation assays were performed by absorbance measurement. Minimum inhibitory concentrations of the antimicrobials recommended by the European Food Safety Authority were established. Total lactic acid and the ratio of D/L lactate isomers were determined with a Megazyme enzymatic kit. The ability of the isolate to produce biogenic amines was tested by qualitative and quantitative monitoring. Hemolysis was assessed phenotypically on MRS agar enriched with sheep blood. The strain was tested for its capability to adhere to mucin and Caco-2 cells. The antagonistic effects of the strain against *C. sakazakii* were further evaluated *in vitro* on mucin and cultured Caco-2 cells. The LAB strain was added simultaneously with, before, and after *C. sakazakii* to Caco-2 cells for competition, exclusion and displacement assays, respectively. Data analysis was performed in R using one-way analysis of variance, and the experimental groups were compared with the controls using Tukey's test. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion

There was no significant difference in the survival rate of M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 at pH = 4. After 2 h of incubation at pH = 2.5, the survival rate of *L. plantarum* ATCC 8014 was estimated to be higher than strain M17, but this difference was not significant. After 4 hours of incubation at pH = 8, M17 showed a higher survival rate than *L. plantarum* ATCC 8014, and this difference was significant after transfer from pH = 4. These results confirm the appropriate viability of M17 in the gastrointestinal tract. Both M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 developed the color yellow in the L-arginine hydrolysis assay, which confirms the safety of these strains. The percentage of auto-aggregation for M17, *L. plantarum* ATCC 8014, and *Lactobacillus rhamnosus* LGG was estimated at 24.38, 25.28, and 32 after 6 hours, respectively, and no statistically significant difference between the two isolates were noticed. Given

1 and 2– Ph.D. Graduate and Professor of Department of Food Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: habibi@um.ac.ir)
3- Professor of Department of Food Science, Copenhagen University, Denmark
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.78002.1193

the auto-aggregation and co-aggregation parameters of M17, this strain may constitute a defense mechanism against *C. sakazakii*. Strain M17 showed resistance to kanamycin and clindamycin antibiotics. With intrinsic resistance, the risk of transferring resistance genes is not only speculative, but practically impossible. Intrinsic resistance of lactic acid bacteria may be considered desirable because it ensures their survival when the host is treated with antibiotics. Both D and L isomers of lactic acid were produced by the studied strains. In humans, D(-)-lactic acidosis is a rare metabolic complication that has only been reported in individuals with short bowel syndrome). Clinical studies have shown that the consumption of probiotic bacteria producing D(-)-lactic acid is safe for children and does not cause a long-term increase in blood D(-)-lactic acid. The reference *L. plantarum* strain and M17 did not produce biogenic amine precursors, and had no ß-hemolytic activity. Mucin adhesion assay exhibited that M17 has less adhesion (12.10 ± 1.14 %) than *L. plantarum* ATCC 8014 (13.33 ± 2.30 %) and LGG (15.93 ± 2.06 %) although these differences were not statistically significant. However, the amount of adhesion for the positive control sample *Escherichia coli* K12 (25.19 ± 4.40 %) was significantly higher than those of the other strains. Compared to the positive control, M17 had a significantly lower adhesion rate (6.8 ± 1.41) to CaCo-2 cells. This value was estimated at 13.77 ± 3.53 % for the reference strain and 21.6 ± 7.54 % for *Lactobacillus fermentum* PCC (positive control). In antagonistic assays, M17 was able to reduce the adhesion of *C. sakazakii* to mucin and CaCo-2 cells in all three methods of exclusion/inhibition, competition and displacement. Statistical analysis of the results does not show a significant difference between M17 and LGG. Therefore, the performance of M17 is similar to that of the standard probiotic LGG.

Conclusion

Lactic acid bacteria with acceptable ability to adhere to epithelial cells can be suitable for colonization in the intestine. They can act as a barrier to fight pathogens through various competitive mechanisms, such as co-aggregation with pathogens and adhesion. The M17 strain has an acceptable immune profile and probiotic properties because it shows an acceptable antagonistic activity against *C. sakazakii* invasion.

Acknowledgement

This study was supported by Ferdowsi University of Mashhad (Research affairs) [project No.:46718] and the research infrastructure at the University of Copenhagen.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, *In vitro* properties, *Lactiplantibacillus plantarum*, Probiotic

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 3, Oct.-Nove. 2023, p. 557-575

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲ ص. ۵۷۵-۵۵۷

مقاله پژوهشی

اثر *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* پنیر موتال بر چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به سلول‌های روده‌ای

سعیده سادات فاطمی زاده[۱]- محمد باقر حبیبی نجفی[۲*]- دنیس سندریس نیلسن[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

چکیده

کرونوباکتر ساکازاکی موجب نگرانی تولیدکنندگان شیرخشک نوزادان است. در این مطالعه ایزوله *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* M17 از پنیر سنتی‌موتال (شماره دسترسی KX572391) به همراه سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC ۸۰۱۴) جهت کنترل *کرونوباکتر ساکازاکی* مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی خواص پروبیوتیکی و ایمنی، آزمون‌هایی جهت بررسی بقای جدایه، هیدرولیز ال- آرژنین، خود انبوهش[۴]، حساسیت آنتی بیوتیکی، تولید ایزومرهای اسید لاکتیک، تولید آمین‌های بیوژنیک، فعالیت همولیتیک، چسبندگی به موسین و چسبندگی به سلول‌های Caco-2 صورت پذیرفت. به منظور بررسی اثر ایزوله M17 بر *کرونوباکتر ساکازاکی*، پارامترهای هم انبوهش[۵]، چسبندگی به موسین و چسبندگی به سلول‌های Caco-2 به همراه باکتری استاندارد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LGG صورت پذیرفت. سویه M17 ۹۱٪ در شرایط مشابه اسید معده و ۸۹٪ در غلظت مشابه نمک‌های صفراوی زنده ماند، و توانایی خود انبوهش بیش از ۲۴٪ را نشان داد. چسبندگی ایزوله M17 در شرایط *برون تنی* به موسین و سلول‌های Caco-2 به ترتیب در مقادیر ۱۲ و ۷٪ ثبت شد. ایزوله مورد مطالعه دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی در مقایسه با نمونه استاندارد است و می‌تواند کاندید مناسبی جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک در شیرخشک نوزادان باشد. با این حال، در آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی، ایزوله M17 در برابر کانامایسین و کلیندامایسین مقاومت نشان داد، که این ویژگی امکان استفاده از این ایزوله را محدود خواهد کرد. نتایج برآورد اثر پروبیوتیکی M17 بر *کرونوباکتر ساکازاکی* نشان از عملکرد مشابه با سویه استاندارد LGG دارد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، *کرونوباکتر ساکازاکی*، *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم*، ویژگی‌های برون تنی

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: habibi@um.ac.ir)
۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم، دانشگاه کپنهاگ، دانمارک

4- Auto-aggregation
5- Co-aggregation

مقدمه

کرونوباکتر[1]ها، باکتری‌های میله ای گرم منفی، متحرک، غیر اسپورزا و تاژک دار عضو خانواده انتروباکتریاسه[2] هستند (Farmer et al., 1980 ؛ Food Safety Authority of Ireland, 2011). *کرونوباکتر ساکازاکی*[3] یک پاتوژن فرصت طلب و عامل مهم در آلودگی پودر شیر خشک است که با شیوع بیماری در نوزادان، به خصوص در بخش‌های مراقبت‌های ویژه نوزادان مرتبط است (Bowen and Braden, 2006). مطالعات نشان داده که pH معده نوزادان نسبت به بزرگسالان بالاتر بوده (خنثی در بدو تولد و بین ۲/۳ الی ۳/۶ تا ۳ سالگی) (Blackburn, 2016؛ Erickson et al., 2005) و این امر می‌تواند بقای کرونوباکتر را تسهیل کند (Pagotto and Farber, 2009).

اگر چه بروز بیماری توسط *کرونوباکتر ساکازاکی* به طور کلی ناچیز است، اما میزان مرگ و میر نوزادان به علت درگیری با این باکتری ۳۳-۸۰٪ گزارش شده است (Lai, 2001؛ Drudy et al., 2006؛ Gurtler et al., 2005 ؛ Nazarowec-White and Farber, 1997). در نتیجه چسبیدن و تهاجم باکتریایی به خطوط سلولی اندوتلیال مویرگی مغز انسان، بیماری اغلب منجر به تأخیر نمو و اختلال در عملکرد ادراکی می‌شود. تعدادی از مطالعات نشان داده اند که پروتئین‌های غشای خارجی A و X *کرونوباکتر ساکازاکی* در حمله و عبور از سلول‌های اندوتلیال مویرگی مغز، که سد خونی-مغزی را تشکیل می‌دهند، نقش دارند (Mohan Nair et al., 2009).

حضور محافظ میکروبیولوژیکی در شیر خشک می‌تواند به نگه داشتن ارگانیسم بیماری زا در مقادیر کم پس از بازسازی کمک کند و خطر ابتلا به بیماری فاجعه بار را کاهش دهد (Kent et al., 2015). پروبیوتیک‌ها در حال حاضر به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده ای تعریف می‌شوند که به هنگام استفاده در مقادیر کافی، بر سلامت میزبان تأثیر مثبتی می‌گذارند (Guarner and Schaafsma, 1998؛ CODEX Alimentarius Commission, 2008). مطالعات علمی اخیر در مورد خواص و عملکرد میکروارگانیسم‌های زنده در مواد غذایی نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در فعالیت‌های ایمونولوژیکی، گوارشی و تنفسی ایفا می‌کنند و می‌توانند تأثیر قابل توجهی در کاهش بیماری‌های عفونی در کودکان داشته باشند (FAO/WHO, 2006b). هانتر و همکاران (Hunter et al., 2009) نشان دادند که *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* از آسیب سلول‌های اپی تلیال روده ای ناشی از اکسید نیتریک تولید شده در نتیجه حضور *کرونوباکتر ساکازاکی* در یک مدل نوزاد موش مبتلا به *انتروکولیت* نکروزان جلوگیری می‌کند (Hunter et al., 2009). کولادو و همکاران (Collado et al., 2008a) برای مقابله با چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به مخاط جدا شده از انسان، سویه های پروبیوتیک را مورد آزمایش قرار دادند (این مطالعه شامل LGG[4] نبود.

به منظور فراهم کردن مواد غذایی فراسودمند برای یک جمعیت هدف، انتخاب منطقی بهترین کاندیداهای پروبیوتیک با اثبات ادعاهای سلامتی بخش آنها توصیه می‌شود (Arboleya et al., 2012). بنابراین خواص ویژه سویه‌های پروبیوتیک باید با دقت تعیین و تأثیر هر سویه بر سلامت میزبان به صورت موردی نشان داده شود (Campana et al., 2017). باکتری‌های پروبیوتیک مختلفی شناسایی شده‌اند که قادر به مهار پاتوژن‌های بالقوه هستند. با این حال، مطالعات اندکی به بر هم کنش مستقیم بین پروبیوتیک و باکتری *کرونوباکتر ساکازاکی* پرداخته اند. در این مطالعه، برای اولین بار اثر جدایه *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* بر چسبندگی باکتری *کرونوباکتر ساکازاکی* به سلول‌های اپی‌تلیال روده ای، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و فعال‌سازی جدایه لاکتوباسیلوس فرآورده لبنی سنتی

باکتری *لاکتوباسیلوس* مورد استفاده در این مطالعه، در پژوهش عزیزی و همکاران (Azizi et al., 2017) از فرآورده لبنی سنتی پنیر موتال جداسازی شد. به منظور فعال‌سازی جدایه در دسترس، نمونه از فریزر ۸۰- (Holm & Halby، پرونپی، دانمارک) خارج و در بن ماری دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محتویات تیوب بر روی محیط کشت MRS آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد (Holm & Halby، پرونپی، دانمارک).

آماده‌سازی کشت‌های *کرونوباکتر ساکازاکی*

کرونوباکتر ساکازاکی از مرکز کلکسیون باکتری دانشگاه گوتنبرگ با شماره دسترسی CCUG 28860 خریداری شد. به منظور فعال سازی، *کرونوباکتر ساکازاکی* به صورت کشت شبانه در محیط کشت BHI براث و سپس روی محیط کشت VRBG آگار (oxoid،

1- *Cronobacter*
2- *Enterobacteriaceae*
3- *Cronobacter sakazakii*

4- *Lactobacillus rhamnosus* (LGG)

راسکیله، دانمارک) در شرایط میکروآئروفیلیک با استفاده از جار بی هوازی و گازپک در دمای ۳۷°C کشت داده شد (Charchoghlyan *et al.*, 2016).

ارزیابی بقای جدایه *لاکتوباسیلوس* در مدل برون‌تنی نیمه دینامیک

برای انجام این آزمایش از روش Kos *et al.*, 2000 با اصلاحات جزئی استفاده شد. از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ (خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به عنوان نمونه شاهد در این آزمایش استفاده گردید. به شکل مختصر، ابتدا نمونه‌های شاهد و *لاکتی پلانتی باسیلوس* به مدت ۲۴ ساعت در MRS براث کشت داده شدند. محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ×g ۲۸۱۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 3_30K، آلمان) و سپس با استفاده از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ سه بار شستشو داده شد. حجم‌های دو میلی‌لیتری از سوسپانسیون سلول‌های شسته شده به فلاسک‌های استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر شیره معده متشکل از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ در pH ۲/۵ و ۴/۰، تنظیم شده با اسید کلریدریک ۱ مولار و پپسین (سیگما، آمریکا) اضافه شده (۳ گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک شیکر چرخان (۱۵۰ دور در دقیقه)، حجم‌های ۱ میلی‌لیتری از هر فلاسک در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه خارج شده و شمارش سلول‌های زنده انجام گردید. سپس محیط کشت موجود در هر شیره معده با سانتریفوژ شدن در ×g ۲۸۱۰ به مدت ۱۰ دقیقه شسته شده، در ۵ میلی‌لیتر محلول NaCl ۰/۵٪ به تعلیق در آمده و با ۱۰ میلی‌لیتر از مایعات شبیه‌سازی شده روده (متشکل از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ در pH ۸/۰ حاوی صفرا (۱۰ g/l) و پانکراتین (۱ g/l)) مخلوط شدند. این مخلوط در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک شیکر چرخان (۱۵۰ دور در دقیقه) انکوباسیون و سپس حجم‌های ۱ میلی‌لیتری بعد از ۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه خارج و شمارش سلول‌های زنده انجام گردید. هر آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین CFU/ml اعلام گردید (de Carvalho *et al.*, 2009).

هیدرولیز ال-آرژنین جدایه *لاکتوباسیلوس*

بررسی هیدرولیز ال-آرژنین توسط جدایه *لاکتوباسیلوس* با کشت در محیط آرژنین دار و تغییر رنگ معرف نسلر انجام گردید. بدین منظور، یک کلنی یا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به محیط مایع حاوی ۰/۳٪ اسید آمینه ال-آرژنین منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). پس از پایان مدت گرمخانه گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار داده و تغییر رنگ بررسی گردید. ایجاد رنگ نارنجی مایل به قرمز نشان دهنده واکنش مثبت و برای استفاده در محصولات شیرخواران و غذای کودک، غیر قابل قبول است. در این آزمایش از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آنالیز انبوهش باکتریایی جدایه *لاکتوباسیلوس*

سویه‌های دارای بالاترین درصد خود انبوهش و هم انبوهش، سویه‌های پروبیوتیکی برتر محسوب می‌شوند (Collado *et al.*, 2008b). آزمون خود انبوهش جدایه براساس روش دل ری و همکاران (Del Re *et al.*, 2000) و توماس و همکاران (Tomás *et al.*, 2005) پس از تغییر جزئی به شرح زیر انجام گردید. جدایه *لاکتوباسیلوس* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C در MRS براث در شرایط میکروآئروفیلیک با استفاده از جار بی هوازی و گازپک کشت داده شد. سپس محیط کشت باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ و سوسپانسیون سلولی در ۱۰ ml بافر PBS تا حدود ۱۰^۸ CFU/ml (۰/۲–۰/۳ $OD_{۵۵}$) مجددا حل گردید. هر سوسپانسیون برای ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت انکوباسیون شد. سپس در هر ساعت، ۱ ml از سوسپانسیون بالایی برداشته شده و جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Genesys 30، Thermo Fisher Scientific، آمریکا). درصد خود انبوهش (Auto-A%) طبق فرمول ۱ محاسبه گردید (Campana *et al.*, 2017).

$$Auto\text{-}A\% = ۱ - (A_t/A_0) \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

که در آن A_t جذب در زمان‌های مختلف و A_0 جذب در زمان صفر است. نتیجه نهایی خود انبوهش بر مبنای آخرین میزان جذب (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) ذکر می‌شود.

برای آزمون هم انبوهش، مقادیر ۲ میلی‌لیتری از سوسپانسیون های باکتریایی *لاکتوباسیلوس* و *کرونوباکتر* با غلظت استاندارد سلولی (۱۰^۸ cells/ml، A_{600} nm = ۰/۲۵ ± ۰/۰۵، ۰/۵ مک فارلند) به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق بدون تکان دادن قرار گرفت. نمونه‌های حاوی مقادیر ۴ میلی‌لیتری از سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در هر ساعت، ۱ ml از سوسپانسیون بالایی برداشته شده و جذب مخلوط ها (*لاکتوباسیلوس* و *کرونوباکتر ساکازاکی*) طی ۴ ساعت انکوباسیون بررسی شد. نتیجه نهایی هم انبوهش بر مبنای آخرین میزان جذب (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) ذکر می‌شود. جذب برای مخلوط و برای سوسپانسیون

های باکتری به تنهایی تعیین، و درصد هم انبوهش طبق معادله زیر محاسبه شد، که در آن A_x و A_y به ترتیب نشان‌دهنده خواص انبوهش جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* و *کرونوباکتر* به تنهایی و A(x + y) انبوهش ترکیبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* و *کرونوباکتر* است. همه آزمایش ها در ۳ تکرار انجام شدند (Campana *et al.*, 2017).

$$\%Coaggregation = \frac{((A_x + A_y)/2) - A(x+y)}{A_x + A_y/2} \times 100$$ (۲)

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه *لاکتوباسیلوس*

جدایه لاکتوباسیلوس از لحاظ انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج انسانی که قابل انتقال هستند، مورد بررسی قرار گرفت. اساس روش شامل تست مقاومت/حساسیت بر اساس آزمون میکرودیلوشن است (Połka *et al.*, 2016). بدین منظور، جدایه *لاکتوباسیلوس* به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MRS آگار و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس پیشنهادات ادارهٔ ایمنی مواد غذایی اروپا، جنتامایسین (۱۲۸ mg/L)، کانامایسین (۱۰۲۴ mg/L)، استرپتومایسین (۲۵۶ mg/L)، تتراسایکلین (۶۴ mg/L)، اریترومایسین (۱۶ mg/L)، کلیندامایسین (۳۲ mg/L)، آمپی سیلین (۱۶ mg/L)، ونکوماسین (۱۶ mg/L) و کلرامفنیکول (۶۴ mg/L) بود. تمام آزمون‌ها در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی استریل (پلی استایرن) حاوی غلظت‌های مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق با پروتکل ISO/IDF انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان دوره انکوباسیون، میزان رشد و تکثیر نمونه با مشاهده چشمی خوانده شد (Połka *et al.*, 2016). در این آزمایش از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان شاهد استفاده گردید.

ارزیابی تولید ایزومرهای لاکتیک اسید

تولید اسید لاکتیک در سوپرناتانت‌های حاصل از کشت هر یک از جدایه *لاکتوباسیلوس* و نمونه شاهد (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۸۰۱۴ ATCC) رشد کرده در شرایط مطلوب خود با کیت تجاری (D-لاکتیک اسید/L-لاکتیک اسید، مگازایم) در سه تکرار مستقل تعیین گردید (Muñoz-Quezada *et al.*, 2013).

ارزیابی تولید آمین‌های بیوژنیک

توانایی برخی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در تولید آمین‌های بیوژنیک سمی به وجود فعالیت آمینو اسید دکربوکسیلاز مرتبط است. از این رو، می‌توان از یک روش کیفی بر اساس تغییر رنگ شاخص بروموکروزول بنفش (سیگما آلدریچ، کپنهاگ، دانمارک) از زرد به بنفش در حضور هیستیدین، لیزین، اورنیتین و تیروزین اضافه شده به یک محیط کشت محدود غربالگری (Bover-Cid and Holzapfel, 1999) حاوی تریپتون (۰/۵٪)، عصاره مخمر (۰/۵٪)، کلرید سدیم (۰/۵٪)، توئین ۸۰ (۰/۰۵٪)، سولفات منیزیم (۰/۰۲٪)، سولفات منگنز (۰/۰۰۵٪)، سولفات آهن (II) (۰/۰۰۵٪) و کربنات کلسیم (۰/۰۱٪) در pH ۵/۰ با نشانگر بروموکرزول بنفش و بدون افزودن گلوکز (Møller *et al.*, 2020) استفاده کرد. تغییر رنگ شاخص بروموکروزول بنفش از زرد به بنفش به عنوان فعالیت معنی دار آمینو اسید دکربوکسیلاز به حساب می‌آید که مربوط به حداقل ۳۵۰ میلی گرم از یک آمین بیوژنیک خاص/ لیتر است (Olasupo *et al.*, 2001). برای انجام این آزمایش از سویه *لاکتوباسیلوس برویس* CECT ۴۱۲۱ به عنوان کنترل مثبت برای تولید تیرامین و سویه *لاکتوباسیلوس پارابوچنری* KUH8 به عنوان کنترل مثبت برای تولید هیستامین، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان نمونه شاهد و جدایه M17 استفاده شد. سویه‌هایی که قبلاً در MRS براث کشت شده بودند، در ۱۰۰ میکرولیتر به محیط‌های محدود حاوی اسیدهای آمینه و بروموکرزول بنفش تلقیح شدند. لوله‌های تلقیح شده به همراه لوله‌های کنترل منفی (محیط محدود تلقیح نشده) به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و هر ۲۴ ساعت تغییر رنگ مشاهده شد. آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند (Pérez Martínez *et al.*, 2012). به منظور تأیید تولید آمین‌های بیوژنیک، پس از ۵ روز، ۱/۲ میلی‌لیتر از محیط مرحله قبل جمع‌آوری، و به مدت ۳۰ دقیقه در g ×۹۶۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر در لوله‌های اپندورف استریل جدید فیلتر، و تا زمان مشتق‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت آمین‌های بیوژنیک مواد رویی با استفاده از UPLC بر أساس روش ردروئلو و همکاران (Redruello *et al.*, 2013) اندازه‌گیری شد. مایع رویی فیلتر (۰/۴۵ µm غشای استات سلولز، VWR، سوبورگ، دانمارک)، و ۱۰ برابر در هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار رقیق شد. سپس به ۱۷۵ میکرولیتر از بافر بورات ۱ مولار (pH ۹/۰)، ۷۵ میکرولیتر متانول و ۲ میکرولیتر L-آمینو آدیپیک اسید (۰/۰۷ میلی مولار) اضافه شد. پس از آن، ۳ میکرولیتر دی اتیل اتوکسی متیلن مالونات (DEEMM) اضافه، مخلوط ورتکس شد، و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حمام اولتراسوند به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند تا DEEMM غیرفعال شود. نمونه‌ها سپس سانتریفیوژ شدند (۱۰ دقیقه در g ×۹۶۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و با استفاده از یک غشای PTFE (۰/۲۲ میکرومتر، VWR) در ویال مخروطی

(VWR) فیلتر شدند. مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه مشتق شده (۱۶ درجه سانتی‌گراد) با استفاده از ابزار UPLC (سیستم H-Class Acquity UPLCTM، Waters، تاستروپ، دانمارک) متصل به یک حسگر آرایه فوتودیود در ۲۸۰ نانومتر، با یک ستون (Acquity BEH C18، ۱/۷ μm، ۲/۱×۱۰۰ mm، واترز) در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، طبق روش گزارش شده توسط (Redruello *et al*., 2013) مورد تحلیل قرار گرفت. معرف‌ها درجه HPLC بودند و از سیگما آلدریچ (کپنهاگ، دانمارک) تهیه شدند. استاندارد با ۱۸ ترکیب آمینو از ترمو فیشر (راسکیله، دانمارک) خریداری شد. کروماتوگرام‌ها با تمام پیک‌های مربوط به ۳۰ ترکیب آمینه مورد بررسی (شامل ۲۲ اسید آمینه، یون آمونیوم و ۷ آمین بیوژنیک) در مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند و پروفایل های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Empower (نسخه ۳، واترز) آنالیز شدند (Møller *et al*., 2020).

ارزیابی فعالیت همولیتیک

به منظور برآورد فعالیت همولتیک جدایه پروبیوتیک مورد مطالعه، آزمایش مطابق استاندارد ۱۹۴۵۹ صورت پذیرفت (Iranian National Standard No. 19459. 2014). بدین منظور جدایه *لاکتوباسیلوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC ۸۰۱۴) بر روی محیط کشت آگار حاوی خون گوسفند (۷٪ خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه ای کشت داده شدند. پلیت‌ها به صورت وارونه در دما و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری و پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف حاصل از هیدرولیز سلول‌های خونی در اطراف کلنی ها مورد بررسی قرار گرفتند. وجود هاله شفاف نشان دهنده واکنش مثبت و همولیز نوع بتا است که از نظر ایمنی نامطلوب است.

چسبندگی به موسین

به منظور بررسی چگونگی اتصال باکتری به موسین از روش (Bengoa *et al*., 2018) استفاده شد. به شکل مختصر، موسین (سیگما، آمریکا) با غلظت ۳ گرم در لیتر با استفاده از PBS حل و فیلتراسیون (۰/۲۲ μm) گردید و سپس برای اتصال به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن استریل (Maxisorp Nunc، راسکیله، دانمارک) در آن وارد گردید. بدین منظور، پلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. انکوباسیون مجدد به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا محل‌های اتصال خالی در پلیت پلی استایرن به حداقل برسد. در نهایت، پلیت با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر PBS دو بار شستشو داده شد. یک میلی لیتر از نمونه‌های باکتری کشت داده شده در ۱۰۰۰ ×g و در ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ، و پلت تشکیل شده دو بار با محلول PBS شستشو داده شد. پلت باکتری در ۱ میلی لیتر محلول PBS حل گردید و سپس با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و در OD ۵۵۰ nm = غلظت باکتری‌ها در ۱۰^{۹} واحد تشکیل دهنده کلنی تنظیم گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هر باکتری به چاهک‌ها منتقل گردید. محیط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. چاهک‌ها ۶ بار با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر محلول PBS شستشو داده شد تا باکتری‌هایی که اتصال پیدا نکرده اند از پلیت حذف شوند. دویست میکرولیتر از محلول ترایتون X100 با غلظت ۵ میلی لیتر/لیتر در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا باکتری‌های متصل شده آزاد شوند. صد میکرولیتر از هر چاهک خارج و در PBS رقیق شد و بر روی پلیت MRS آگار کشت داده شد. از سویه *اشرشیا کلی* K12 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس شمارش کلنی صورت گرفت.

چسبندگی به سلول‌های Caco-2

میزان چسبندگی جدایه M17 به سلول‌های اپی‌تلیال مطابق استاندارد ۱۹۴۵۹ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). سلول‌های Caco-2 با غلظت ۱۰^{۵} سلول در چاهک در صفحات کشت ۱۲ چاهکی (Corning® Costar®، مرک، دانمارک) کاشته شدند و به مدت ۱۵ روز در اتمسفر مرطوب برای رسیدن به تمایز سلولی انکوبه شدند (Briske- Anderson, *et al*., 1997). سلول‌های Caco-2 به مدت ۱ ساعت در معرض تیمار با سوسپانسیون *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* در DMEM بدون آنتی‌بیوتیک (۵ ×۱۰^{۸} CFU / چاهک) قرار گرفتند. بافر فسفات (غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار) به مخلوط‌های تیمار اضافه شد تا ۰/۲ ± ۷/۳ pH حفظ شود. تک‌لایه‌های Caco-2 با محلول نمکی بافر فسفات Dulbecco (DPBS) شسته شدند تا سلول‌های باکتریایی غیر متصل، حذف شوند. سپس *لاکتوباسیلوس*‌های چسبیده با استفاده از ۱ میلی‌لیتر DPBS با محلول ۱٪ (v/v) تریتون X-100 جدا شدند. تعداد باکتری‌های چسبنده با استفاده از روش شمارش پلیت بر روی آگار MRS تعیین و نتایج به صورت درصد باکتری‌های چسبیده نسبت به مقدار باکتری‌های اضافه شده (درصد CFU باکتری‌های چسبیده / CFU باکتری‌های اضافه شده) بیان شد (Campana *et al*., 2017).

از سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PCC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Srimahaeak *et al*., 2021).

جلوگیری از چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به سلول‌های CaCo-2

آزمون‌های مهار کنندگی شامل حذف، رقابت و جابجایی با استفاده از سویه M17 انجام شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی سویه M17 و *کرونوباکتر ساکازاکی* همان طور که در بالا توضیح داده شد، تهیه شدند. برای آزمون حذف، تک لایه‌های Caco-2 با ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون M17 به مدت ۱ ساعت تیمار و سپس با PBS شسته شدند تا باکتری‌های غیر چسبنده حذف شوند. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر از *کرونوباکتر ساکازاکی* به تک‌لایه‌های سلولی برای ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO2 اضافه شد. در پایان انکوباسیون، سلول‌ها ۳ الی ۵ بار با PBS شسته، و با تریتون X-۱۰۰ (۰/۵٪ در PBS) لیز شدند. در نهایت، سلول‌های لیز شده به صورت سریالی در محلول نمکی فیزیولوژیکی رقیق شدند، به محیط کشت حاوی آگار منتقل و در شرایط کشت مناسب برای شمارش CFU/ml انکوبه شدند. برای آزمون رقابت، سلول‌ها در معرض سوسپانسیون مخلوط (۱:۱) از *کرونوباکتر ساکازاکی* و M17 قرار گرفتند. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO2، تک لایه‌ها ۳ الی ۵ بار با PBS شسته، و با تریتون X-۱۰۰ (۰/۵٪ در PBS) لیز شدند. سپس سلول‌های لیز شده به صورت سریالی در سالین رقیق شدند، به محیط کشت حاوی آگار منتقل و در شرایط کشت مناسب برای شمارش CFU/ml انکوبه شدند. برای ارزیابی توانایی سویه M17 در جابجایی با *کرونوباکتر ساکازاکی*، این باکتری به سلول‌های Caco-2 اضافه، و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو و حذف پاتوژن‌های غیر متصل، M17 به چاهک‌ها افزوده، و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، چاهک‌ها شسته، و سلول‌ها لیز شدند و شمارش باکتری‌ها انجام شد. مهار *کرونوباکتر ساکازاکی* به عنوان تفاوت بین چسبندگی کرونوباکتر قبل و بعد از افزودن سویه M17 محاسبه شد. سه آزمون مستقل و هر سنجش در چهار تکرار انجام شد (Campana *et al*., 2017).

جلوگیری از چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به موسین

به منظور ارزیابی توانایی سویه M17 در مهار، جابجایی و رقابت، روش (Collado *et al*., 2008b) با برخی تغییرات استفاده شد. چاهک‌های پلی استایرن همان طور که قبلا توضیح داده شد، آماده شدند. برای آزمون مهار، پس از انکوباسیون و شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی M17 (۱۰^۹-۱۰^۸ CFU/ml) به چاهک‌ها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. چاهک‌ها دو بار با PBS شسته شدند و اطمینان حاصل شد که بافر در چاهک‌ها باقی نمانده است. در مجموع ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون *کرونوباکتر ساکازاکی* (۱۰^۸ CFU/ml) اضافه، و به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. برای سنجش جابجایی، روش فوق الذکر انجام شد، اما ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون *کرونوباکتر ساکازاکی* به مدت ۱ ساعت به چاهک‌ها اضافه، و قبل از انکوباسیون با سوسپانسیون M17 شسته شد. برای آزمون رقابت، چاهک‌ها در معرض سوسپانسیون مخلوط (۱:۱) از *کرونوباکتر ساکازاکی* و M17 قرار گرفتند. در تمامی موارد، چاهک‌ها با بافر PBS شسته شده و باکتری‌های متصل پس از افزودن تریتون X-۱۰۰ (۰/۵٪) شمارش شدند. سه آزمون مستقل و هر سنجش در سه تکرار انجام و درصد مهار پاتوژن با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد (Collado *et al*., 2008b):

$$\%\,\text{inhibition} = \frac{(\%\ \text{adherence of pathogen}) - (\%\ \text{adherence of pathogen with probiotic})}{\%\ \text{adherence of pathogen}} \times 100 \quad (۲)$$

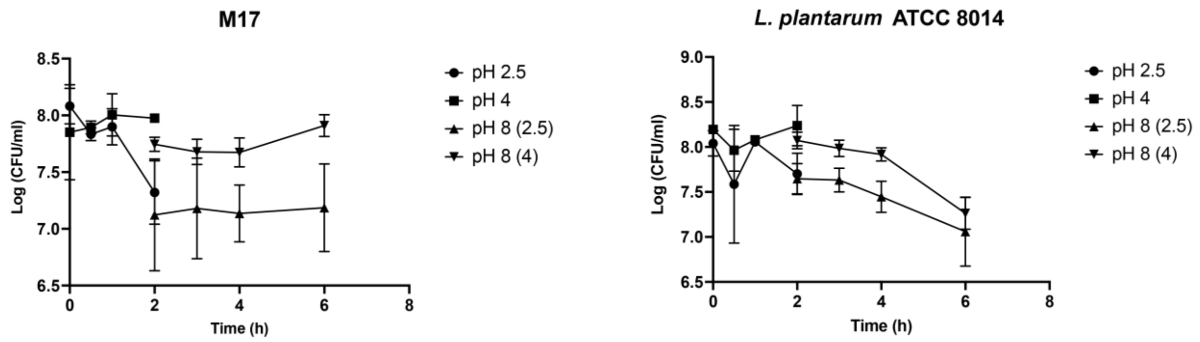
تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری با بسته R انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی ($P < ۰/۰۵$) برای بررسی تفاوت‌های معنی دار بین تیمارها در سنجش چسبندگی مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بقای سویه در شرایط مشابه دستگاه گوارش با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام شد.

نتایج

شناسایی خواص پروبیوتیکی

میزان بقای جدایه M17 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۸۰۱۴ ATCC در فاصله زمانی ۶ ساعته تحت شرایط مشابه دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرار گرفت؛ حرکت توده غذا در دستگاه گوارش حداقل به ۶ ساعت زمان نیاز دارد (Grodner *et al*., 2021). این آزمون شامل مقاومت در برابر pH پایین محیط، پپسین، نمک‌های صفراوی و پانکراتین بود. شبیه سازی اثر انکوباسیون باکتری‌های جدایه M17 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۸۰۱۴ ATCC با شیره معده و روده در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱- شبیه سازی اثر انکوباسیون جدایه M17 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱٤ در شیره معده و روده در فاصله زمانی ٦ ساعته
Fig. 1- Effect of incubation of isolate M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 in simulated gastric and intestinal juice for 6 hours

جدول ۱- درصد زنده‌مانی جدایه‌های M17 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱٤ در شیره معده و روده در فاصله زمانی ٦ ساعته
Table 1- Survival percentage of M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 in simulated gastric and intestinal juice for 6 hours

سویه Strain	*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* M17 *L. plantarum* M17				*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱٤ *L. plantarum* ATCC 8014			
pH	2.5 ۲/۵	4 ۴	8 with initial pH 2.5 ۸ با pH اولیه ۲/۵	8 with initial pH 4 ۸ با pH اولیه ۴	2.5 ۲/۵	4 ۴	8 with initial pH 2.5 ۸ با pH اولیه ۲/۵	8 with initial pH 4 ۸ با pH اولیه ۴
زمان (ساعت) Time (h)	2	2	6	6	2	2	6	6
ضریب زنده مانی (٪) Survival rate	90.55±1.71 abcd	101.76±5.22 a	89.01±6.43 bcd	100.91±4.86 ab	95.79±2.67 abcd	100.52±2.60 abc	87.86±5.92 d	88.63±2.32 cd

مقادیر، میانگین سنجش‌ها با سه تکرار ± انحراف معیار هستند. a,b,c,d داده‌های موجود در هر ردیف با رونوشت‌های متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند (P < ۰/۰۵).
The data are represented as the mean ± standard deviation with three replicates. a,b,c,d, the data in each row indicate significant differences with different transcripts (P<0.05)

بهترین درصد زنده مانی برای هر دو گونه شاهد و تیمار در pH=۴ برآورد گردید. تفاوت معنی داری بین دو گونه مورد مطالعه در pH = ۴ وجود نداشت (P > ۰/۰۵) و حتی تکثیر جزئی نیز در این pH صورت پذیرفت. پس از ۱۲۰ دقیقه حضور در pH = ۲/۵، درصد زنده مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ بیشتر از سویه M17 برآورد گردید ولی این تفاوت معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵). طبق استاندارد ملی ایران ۱۹۴۵۹، پس از آزمون مقاومت به شیره معده، تعداد شمارش شده نباید کمتر از ۱۰^۶ باشد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). پس از ۴ ساعت حضور باکتری‌ها در pH = ۸، جدایه M17 درصد زنده‌مانی بالاتری از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ را نشان داد که این اختلاف پس از انتقال از pH = ۴ معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵) (جدول ۱). این نتایج تأییدی بر مقاومت مناسب جدایه M17 نسبت به شرایط دستگاه گوارش است.

آزمایش هیدرولیز ال-آرژنین به منظور بررسی ایمنی جدایه M17 برای نوزادان انجام شد. این آزمایش کیفی با تغییر رنگ از زرد تا نارنجی متمایل به قرمز باکتری‌های ایمن را از غیر ایمن تفکیک می نماید. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که هر دو نمونه جدایه M17 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ رنگ زرد را نشان دادند که تأییدی بر ایمن بودن این باکتری‌ها می‌باشد. در این آزمایش رنگ مربوط به نمونه کنترل مثبت (باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳) نارنجی متمایل به قرمز گزارش شد.

درصد خود انبوهش برای جدایه مورد مطالعه و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به ترتیب ۲۴/۳۸ و ۲۵/۲۸ بعد از ۶ ساعت برآورد گردید که

از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین نمونه شاهد و جدایه M17 وجود نداشت (P>۰/۰۵). بررسی پارامترهای خود انبوهش و هم انبوهش نشان از توانایی مناسب سویه M17 در مهار *کرونوباکتر ساکازاکی* داشت (جدول ۲). ما از *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LGG به عنوان کنترل مثبت استفاده کردیم که بالاترین توانایی خود انبوهش را نشان داد (۳۲٪). آنالیز آماری بین دو سویه M17 و LGG نشان از تفاوت معنی‌دار آماری ندارد (P > ۰/۰۵). بنابراین سویه M17 دارای ویژگی‌های خودانبوهش و هم انبوهش مشابه با سویه استاندارد LGG است.

جدول ۲- درصد خود انبوهش و هم انبوهش سویه‌های M17 و LGG با *کرونوباکتر ساکازاکی*

Table 2- Percentage of auto-aggregation and co-aggregation of M17 and LGG strains with *C. sakazakii*

سویه Strain	خود انبوهش پس از ٦ ساعت Auto-aggregation after 6 h (%)	هم انبوهش با *کرونوباکتر ساکازاکی* پس از ٦ ساعت Co-aggregation after 6 h (%)
M17	24.38 ± 4.56 [a]	18.09 ± 1.96 [a]
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014 *L. plantarum* ATCC 8014	25.28 ± 4.06 [a]	13.22 ± 1.92 [b]
LGG	32.00 ± 1.40 [a]	21.71 ± 1.72 [a]

مقادیر، میانگین سنجش ها با سه تکرار ± انحراف معیار هستند. [a,b] داده‌های موجود در هر ستون با رونوشت‌های متفاوت اختلاف معنی دار دارند (P < ۰/۰۵).

The data are represented as the mean ± standard deviation with three replicates. a,b, the data in each row indicate significant differences with different transcripts (P<0.05).

به روزرسانی معیارهای ارزیابی مقاومت باکتریایی در برابر آنتی بیوتیک‌ها در انسان و حیوانات بسیار حائز اهمیت است. از این رو، پانل آنتی‌بیوتیکی (EFSA J 732:1–15) برای افزودنی‌ها و یا مواد غذایی مورد استفاده در دام ایجاد شده است (European Food Safety Authority،2008). برای آزمون، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، و کلرامفنیکل استفاده می‌شود. نتایج مقادیر آزمون MIC برای حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس در برابر ۱۰ آنتی‌بیوتیک آزمایش شده در جدول ۳ آورده شده است. سویه مرجع مقادیر MIC کمتری نسبت به مقدار پیشنهادی توسط رهنمود EFSA (2008) نشان داد. با این حال سویه M17 در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و کلیندامایسین از خود مقاومت نشان داد.

مقدار اسید لاکتیک تولید شده برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ ‏۰/۳۱ ± ۱/۹۷، برای سویه LGG ‏۰/۵۱ ± ۱۳/۹۹ و برای نمونه M17 برابر ۰/۹۷± ۱۴/۵۴ گرم در لیتر می‌باشد. هر دو نوع اسید لاکتیک D و L در نمونه‌های مورد بررسی تولید گردید (جدول ۴).

جدول ۳- تعیین میزان حساسیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مرجع و M17 در برابر آنتی‌بیوتیک

Table 3- Antibiotic sensitivity of reference strain *L. plantarum* and M17

ANTIBIOTIC [MIC (μG/ML)]

سویه Strain	آمپی سیلین AMP	جنتامایسین GEN	کانامایسین CAN	اریترومایسین ERY	کلیندامایسین CLI	تتراسایکلین TET	کلرامفنیکول CHL
نقطه انفصال *breakpoint	2	16	64	1	2	32	8
لاکتوباسیلوس پلانتاروم *L. plantarum* ATCC 14917	0.25	<4	64	0.25	1	16	8
M17	0.5	16	128	0.5	4	16	8

* مقادیر توصیه شده EFSA *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هتروفرمانتیو استاندارد ارائه شده است.

*Values are according to EFSA recommendations for heterofermentative *L. plantarum* strains

جدول ٤- مقدار اسیدهای لاکتیک تولید شده به تفکیک برای نمونه‌های مرجع و M17
Table 4- Lactic acid isomers produced by reference strain and M17

سویه Strain	D-لاکتیک اسید D-lactic acid		L-لاکتیک اسید L-lactic acid		لاکتیک اسید کل Total lactic acid
	٪	گرم در لیتر g/L	٪	گرم در لیتر g/L	گرم در لیتر g/L
M17	53.70	7.80 ± 0.64	46.30	6.73 ± 0.34	14.54 ± 0.99
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ *L. plantarum* ATCC 8014	16.89	0.33 ± 0.02	83.11	1.64 ± 0.29	1.97 ± 0.31
LGG	12.07	1.67 ± 1.06	87.93	12.30 ± 0.44	13.99 ± 0.51

تولید آمین‌های بیوژنیک توسط باکتری‌های اسید لاکتیک خاصیت مطلوبی نیست و تنها ایزوله‌های منفی به عنوان پروبیوتیک مناسب هستند. نتایج این بخش نشان داد که علی رغم مثبت شدن نتایج آزمون باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پارابوچنری* KUH8 (تولید کننده هیستامین) و *لاکتوباسیلوس برویس* CECT ۴۱۲۱ (تولید کننده تیرامین) که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند، نمونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مرجع و ایزوله M17 در محیط کشت، پیش‌سازهای آمین بیوژنیک را تولید نکردند (شکل ۲).

مطابق الزامات ایمنی EFSA، نمونه M17 و مرجع فاقد فعالیت بتاهمولتیک بودند، در حالی که نمونه کنترل مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ فعالیت همولتیکی را نشان داد.

بررسی چگونگی اتصال به موسین نیز تایید کرد که سویه M17 چسبندگی کمتری (۱۲/۱۰ ± ۱/۱۴ [a]٪) نسبت به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ (۱۳/۳۳ ± ۲/۳۰ [a]٪) و LGG (۱۵/۹۳ ± ۲/۰۶ [a]٪) دارد، هرچند که از لحاظ آماری این اختلاف‌ها معنی‌دار نبودند (P > ۰/۰۵). با این حال، میزان چسبندگی در نمونه کنترل مثبت (۲۵/۱۹ ±۴/۴۰ [b]) برآورد گردید که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با سایر سویه‌ها دارد (P < ۰/۰۵) (جدول ۵).

یکی دیگر از الزامات ایمنی EFSA، بررسی چسبندگی باکتری به سلول‌های CaCo-2 است. نتایج به دست آمده از این آزمون نشان داد که ایزوله بررسی شده در این مطالعه، در مقایسه با کنترل مثبت، به شکل معنی‌داری درصد چسبندگی کمتری (۶/۸ ± ۱/۴۱ [b]) با سلول های CaCo-2 داشت (P < ۰/۰۵). این مقدار برای نمونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مرجع (۱۳/۷۷ ± ۳/۵۳ [ab]) و نمونه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PCC (۲۱/۶ ± ۷/۵۴ [a]) برآورد گردید (جدول ۶).

بررسی بازدارندگی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک M17 و LGG در سه روش حذف، رقابت و جابه جایی نشان از توان سویه های مورد مطالعه در کاهش چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به سلول های CaCo-2 بود (جدول ۷). سویه LGG درصد بازدارندگی بالاتری را با روش حذف نشان داد، و سویه M17 با روش جابجایی کمترین درصد بازدارندگی را داشت. با این حال، آنالیز آماری نتایج، تفاوت معنی داری بین دو سویه با روش بازدارندگی یکسان نشان نمی‌دهد (P > ۰/۰۵). از این رو، عملکرد M17 مشابه با پروبیوتیک استاندارد LGG می‌باشد.

بررسی بازدارندگی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک M17 و LGG در سه روش مهار، رقابت و جابه جایی توانایی سویه‌های مورد مطالعه در کاهش چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به موسین را نمایش داد (جدول ۸). آنالیز آماری نتایج تفاوت معنی‌داری بین سویه M17 و سویه استاندارد LGG نشان نمی‌دهد (P > ۰/۰۵). از این رو، عملکرد M17 مشابه با پروبیوتیک استاندارد LGG می‌باشد.

جدول ٥- درصد چسبندگی سویه M17 و سویه‌های مرجع به موسین
Table 5- Mucin adhesion of M17 and reference strains

سویه Strain	M17	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 8014 *L. plantarum* ATCC 8014	*اشرشیا کلی* *E. coli* K12
چسبندگی به موسین (٪) Mucin adhesion	12.10 ± 1.14 [b]	13.33 ± 2.30 [b]	25.19 ± 4.40 [a]

جدول ٦- درصد چسبندگی سویه M17 و سویه های مرجع به سلول‌های CaCo-2
Table 6- Caco-2 adhesion of M17 and reference strains

سویه Strain	M17	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 8014 *L. plantarum* ATCC 8014	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* *L. fermentum* PCC
چسبندگی به سلول‌های CaCo-2 adhesion (٪)	6.8 ± 1.41 [b]	13.77 ± 3.53 [ab]	21.6 ± 7.54 [a]

جدول ۷- درصد کاهش چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به سلول‌های CaCo-2 تحت تأثیر سویه‌های M17 و LGG

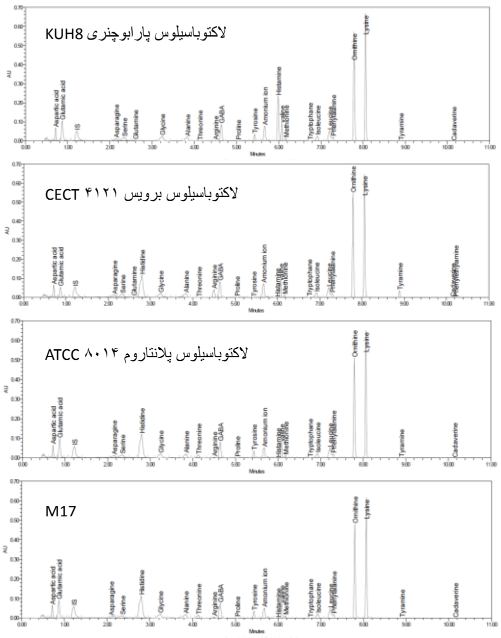
Table 7- Reduction of *C. sakazakii* adhesion to CaCo-2 cells under the influence of M17 and LGG strains

	روش بازدارندگی Antagonism method	حذف Exclusion	رقابت Competition	جابجایی Displacement
سویه Strain	M17	19.10 ± 4.55 ^{ab}	17.21 ± 4.60 ^{ab}	9.86 ± 5.22 ^{b}
	LGG	25.61 ± 5.45 ^{a}	23.42 ± 7.41 ^{a}	15.71 ± 5.70 ^{ab}

جدول ۸- درصد کاهش چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به موسین تحت تأثیر سویه‌های M17 و LGG

Table 8- Reduction of *C. sakazakii* adhesion to mucin under the influence of M17 and LGG strains

	روش بازدارندگی Antagonism method	مهار INHIBITION	رقابت COMPETITION	جابجایی DISPLACEMENT
Strain سویه	M17	14.72 ± 7.06 ^{b}	17.31 ± 3.90 ^{b}	12.44 ± 4.81 ^{b}
	LGG	24.47 ± 2.81 ^{ab}	35.65 ± 6.23 ^{a}	17.53 ± 4.32 ^{b}



شکل ۲- بررسی تولید آمین‌های بیوژنیک در گونه‌های مورد مطالعه

باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پارابوچنری* KUH8 (تولید کننده هیستامین) و *لاکتوباسیلوس برویس* CECT ۴۱۲۱ (تولید کننده تیرامین) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده اند.

Fig. 2- Production of biogenic amines in the studied species

Lactobacillus parabucheneri KUH8 (histamine producer) and *L. brevis* CECT 4121 (tyramine producer) were used as positive controls

بحث

پروبیوتیک‌ها باید قادر به عبور از معده باشند، جایی که pH می تواند تا ۳/۰≥ پایین باشد و به مدت ۲ الی ۴ ساعت زنده بمانند (Shah and Liong, 2005). به همین ترتیب، آنها باید قادر به عبور از دوازدهه، که در آن مقادیر نمک‌های صفراوی می‌تواند تا ۰/۷٪ بالا باشد، زنده بمانند (Barrett *et al*., 2009). زنده ماندن در این شرایط سخت گوارشی، پروبیوتیک‌ها را قادر می‌سازد تا زنده به روده باریک برسند، در آن مستقر شوند و فواید خود را آشکار سازند. مقاومت به صفرا یک پیش نیاز برای استقرار و فعالیت متابولیکی پروبیوتیک‌ها در روده باریک است (Singhal *et al*., 2010). نمک‌های صفراوی دارای اثرات ضد میکروبی علیه برخی از میکروارگانیسم‌ها هستند (Fontana *et al*., 2013) و ممکن است سرعت رشد را کاهش دهند

(Liu *et al*., 2020). با این حال، برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک هیدرولازهای نمک‌های صفراوی تولید می‌کنند که نمک‌های صفراوی مزدوج را هیدرولیز کرده و در نتیجه سمیت آنها را کاهش می‌دهد (Liong and Shah, 2005). میانگین غلظت صفرا در دوازدهه حدود ۰/۳٪ است (Jose *et al*., 2015). در این مطالعه جدایه M17، در محیط کشت مایع حاوی ۱٪ نمک‌های صفراوی مقاومت نشان داد. این یافته‌ها با نتایج چندین مطالعه همخوانی دارد (Abushelaibi *et al*., 2017; Jose *et al*., 2015;Bassyouni *et al*., 2012).

آرژنین برای نوزادان ضروری است زیرا قادر به سنتز آن نیستند (Aristoy and Toldrá, 2012). بنابراین عدم هیدرولیز ال-آرژنین یک معیار انتخاب برای سویه‌های جدید مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک برای نوزادان پیشنهاد شده است. بر اساس این مفهوم، سویه مورد مطالعه می‌تواند کاندیدای مناسبی برای استفاده به عنوان پروبیوتیک در شیر خشک باشد. مطالعات دیگر آمین زدایی آرژنین را توسط سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گزارش کردند (Ruiz-Moyano *et al*., 2009). با این حال برخی از مطالعات، حاکی از عدم توانایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در هیدرولیز آرژنین بودند (Papamanoli *et al*., 2003).

خود انبوهش به تجمع سلول‌های باکتریایی اشاره دارد که از نظر ژنتیکی یکسان هستند (Grady *et al*., 2011). خود انبوهش به توانایی سلول‌های میکروبی برای چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال و سطوح مخاطی مربوط می‌شود (Collado *et al*., 2007; Del Re *et al*., 2000). در این مطالعه، جدایه مورد مطالعه خاصیت خود انبوهش مناسبی از خود نشان داد که نشان دهنده توانایی چسبیدن به اپی‌تلیوم روده و مقاومت در برابر حرکت غذا در لوله گوارش است. خود انبوهش صرفاً آزمایش غربالگری اولیه برای باکتری‌های چسبنده است (Del Re *et al*., 2000). بنابراین، باید سنجش چسبندگی در شرایط *برون تنی* یا *درون تنی* برای اثبات توانایی چسبندگی انجام شود. هم انبوهش، تجمع سلول‌های باکتریایی است که از نظر ژنتیکی متمایز هستند (Grady *et al*., 2011). این ویژگی در جلوگیری از چسبیدن پاتوژن‌ها به مخاط روده مهم است (Botes *et al*., 2008). علاوه بر این، از طریق هم انبوهش، باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیبات ضد میکروبی را در مجاورت با پاتوژن‌ها ترشح می‌کند که مانع بقای آنها در دستگاه گوارش می‌شود (Li *et al*., 2015) . از نتایج، به نظر می رسد که LGG، در مهار *کرونوباکتر ساکازاکی* موثرتر از M17 باشد. به طور کلی، سویه‌های چسبنده تر، درصد هم انبوهش بالاتری را نشان می‌دهند. هم انبوهش مشاهده شده با *کرونوباکتر ساکازاکی* با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Collado *et al*., 2008a).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی است و مکانیسم‌های درگیر عبارتند از عدم وجود هدف، نفوذپذیری کم، غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک و وجود مکانیسم‌های خروجی[۱] (Radulović *et al*., 2012). مقاومت مکرر لاکتیک اسید باکتری‌ها به آمینوگلیکوزیدها و لینکوزامیدها توسط مطالعات مختلف گزارش شده است (Byakika *et al*., 2020). اگرچه مقاومت به تتراسایکلین شایع ترین مقاومت اکتسابی گزارش شده در ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس* با منشأ غذایی است، اما ایزوله مورد مطالعه ما نسبت به تتراسایکلین حساس نبود. نتایج این مطالعه، سایر مطالعات را تأیید می‌کند که نشان دهنده شیوع گسترده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های غذایی لبنی است که تا حدی ناشی از استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در چند سال گذشته در حیوانات و انسان‌ها است (Pesavento *et al*., 2014). نگرانی‌هایی وجود دارد که برخی از لاکتیک اسید باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ممکن است مخازن ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی باشند که قادر به انتقال به پاتوژن‌ها باشند (Mathur and Singh, 2005). با این حال، با مقاومت ذاتی، خطر انتقال ژن‌های مقاومت نه تنها بر اساس حدس و گمان، بلکه عملا غیرممکن است (Radulović *et al*., 2012). به عنوان مثال، تصور می‌شود که مقاومت *لاکتوباسیلوس*‌ها در برابر آمینوگلیکوزیدهایی مانند کانامایسین ذاتی است (Hummel *et al*., 2007). مقاومت لاکتیک اسید باکتری‌ها به کانامایسین و کلیندامایسین در منابع دیگر نیز گزارش شده است (Mathara *et al*., 2008). حساسیت سویه‌های ارزیابی شده در این مطالعه به برخی آنتی بیوتیک‌ها مانند اریترومایسین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل نیز در مطالعات پیشین گزارش شده است (Abushelaibi *et al*., 2017). مقاومت آنتی بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌تواند یک ویژگی مطلوب باشد زیرا بقای آنها را تضمین می‌کند و در نتیجه تعادل طبیعی میکروبیوتای روده را حتی زمانی که میزبان تحت درمان با آنتی بیوتیک است حفظ می‌نماید (Bacha *et al*., 2010).

گونه‌های باکتریایی از جنس باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند L(+)-لاکتیک اسید، D(-)-لاکتیک اسید، مخلوط راسمیک DL-لاکتات یا ترکیبی از این‌ها تولید کنند (Cekola *et al*., 2015). سویه مورد مطالعه توانایی تولید هر دو ایزومر D و L لاکتیک اسید را دارد. در انسان، اسیدوز D(-)-لاکتیک یک رویداد متابولیک نادر است که فقط در افراد مبتلا به سندرم روده کوتاه گزارش شده است (Ewaschuk *et al*., 2005). مطالعات بالینی انجام شده در کودکان نشان می‌دهد که مصرف باکتری‌های پروبیوتیک تولید کننده D(-)-لاکتیک اسید بی خطر است و باعث افزایش طولانی مدت D(-)-

---

1- efflux

لاکتیک اسید خون نمی‌شود (Papagaroufalis *et al*., 2014). علاوه بر این، باکتری‌های تولیدکننده D(-)-لاکتیک اسید قرن‌ها از مواد غذایی تخمیر شده مانند ماست، کلم ترش و خیارشور و اخیراً از مکمل‌های پروبیوتیک بدون علائم منفی مرتبط، توسط انسان مصرف می‌شوند (Vitetta *et al*., 2017).

آمین‌های بیوژنیک که یکی از متابولیت‌های بیوژنیک نامطلوب باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند، باید به عنوان معیاری برای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک استفاده شوند (Pereira *et al*., 2001). مطالعه ما نشان داد که هیچ پتانسیل تولید آمین‌های بیوژنیکی در سویه *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* آزمایش شده وجود ندارد. در تأیید نتایج ما، سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که به عنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک بالقوه شناسایی شده است (Pianpumepong, Noomhorm and 2010) هیچ فعالیت دکربوکسیلازی نشان نداد. مشاهدات مشابهی توسط هولزاپفل و بوور کید (Holzapfel and Bover-Cid, 1999) و ایرکیلا (Erkkilä *et al*., 2001) با استفاده از همین گونه گزارش شده است. با این حال، برخی از محققین در مورد سویه‌های *لاکتوباسیلوس* خاص، نتایج متفاوتی گزارش داده‌اند (Priyadarshani and Rakshit, 2011؛ Holzapfel and Bover-Cid, 1999). این امر، ماهیت اختصاصی بودن این ویژگی برای هر سویه میکروارگانیسم را نشان می‌دهد. همان‌طور که توسط اوزگول (Özogul, 2007) گزارش شده است، تولید آمین‌ها می‌تواند در میان گونه‌های باکتریایی یک خانواده و حتی بین سویه‌های یک گونه باکتری متفاوت باشد. بنابراین، به وضوح مشهود است که برای جلوگیری از تولید آمین‌های بیوژنیک و کاهش خطر مسمومیت، نیاز به شناسایی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتریایی در نظر گرفته شده برای استفاده در مواد غذایی و بررسی توانایی بالقوه آنها در تولید آمین‌های بیوژنیک وجود دارد.

همولیز یکی از عوامل مهم بیماریزایی در باکتری‌های پاتوژن است، و از این رو، یکی از جنبه های ایمنی سویه مورد مطالعه، آزمایش *برون تنی* برای فعالیت همولیتیک در نظر گرفته شده است. در تحقیق حاضر، جدایه M17 باعث همولیز آلفا یا بتا نشد، علی رغم این که همولیز آلفا در بین *لاکتوباسیلوس*‌های با منشأ غذایی و محصولات لبنی غیرمعمول نیست (Kaktcham *et al*., 2012).

پروبیوتیک‌ها باید ابتدا خود را به اپی‌تلیوم روده بچسبانند تا بتوانند مزایای سلامتی را برای میزبان خود به ارمغان آورند (Weimer and Chou, 1999). چسبندگی تا حدی آنها را قادر می‌سازد تا در برابر حرکات لوله گوارش مقاومت کنند (Tomáška *et al*., 2015). علاوه بر این، چسبندگی پروبیوتیک‌ها موجب جابجایی پاتوژن‌ها از سطح مشترک مجرای مخاطی از طریق رقابت برای مکان‌های اتصال در سطوح اپی‌تلیال و/یا مخاطی می‌شود (Collado *et al*., 2007؛ Veerappan *et al*., 2012). مطالعات همچنین گزارش داده اند که چسبندگی برخی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بر روی اپی‌تلیوم روده باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی خاص می‌شود. اتصال پروبیوتیک‌ها همچنین می‌تواند عملکرد سد روده[1] را بهبود بخشد و نفوذپذیری آن را در برابر پاتوژن‌ها و آنتی‌ژن‌ها کاهش دهد (Caballero-Franco *et al*., 2007). علاوه بر این، اتصال آنها به روده می‌تواند باعث تحریک ترشح ترکیبات ضد میکروبی توسط سلول‌های اپی‌تلیال روده شود (Veerappan *et al*., 2012). ما در این مطالعه چسبندگی *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* سویه M17 و همچنین توانایی آن در بازدارندگی چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به موسین و سلول‌های Caco-2 را آزمایش کردیم. مقادیر چسبندگی در محدوده ای بود که قبلاً برای *لاکتوباسیلوس*‌ها گزارش شده بود (Collado *et al*., 2007).

توانایی حذف یا جابجایی پاتوژن‌ها از موسین و سلول‌های روده توسط سایر *لاکتوباسیلوس*‌های پروبیوتیک قبلا گزارش شده است (Sherman *et al*., 2005). به نظر می‌رسد توانایی بازدارندگی چسبندگی پاتوژن‌ها هم به *لاکتوباسیلوس*‌ها و هم به پاتوژن آزمایش شده بستگی دارد که نشان دهنده اختصاصیت بسیار بالا است. سویه LGG با روش حذف، مؤثرترین روش بازدارنده چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* به سلول‌های Caco-2 بود، در حالی که همین سویه با روش رقابت بیشترین درصد بازدارندگی چسبندگی به موسین را نشان داد. هر دو سویه با روش جابجایی کمترین توانایی بازدارندگی چسبندگی به سلول‌های Caco-2 و موسین را داشتند. این نتایج حاکی از آن است که بازدارندگی چسبندگی می‌تواند با چسبنده‌ها و گیرنده‌های اختصاصی پروبیوتیک و پاتوژن برای آن با هم رقابت کنند (Lee and Puong, 2002) یا با عوامل دیگری مانند هم انبوهش هر دو سویه (Reid *et al*., 1988) مرتبط باشد. طبق نتایج ما می‌توان اظهار کرد که به‌ویژه هم انبوهش بین *کرونوباکتر ساکازاکی* و سویه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌تواند در کاهش چسبندگی پاتوژن به موسین نقش داشته باشد و این ویژگی می‌تواند برای غربال‌گری پروبیوتیک‌های خاص برای استفاده در شیرخشک نوزادان استفاده شود.

این مطالعه اختصاصیت بسیار بالایی را در بازدارندگی چسبندگی *کرونوباکتر ساکازاکی* توسط سویه مورد مطالعه گزارش می‌کند که نشان‌دهنده نیاز به شناسایی موردی سویه‌های پروبیوتیک است. چنین مطالعاتی امکان انتخاب سویه‌هایی را با کاربرد بالقوه در پیشگیری یا درمان عفونت‌های گوارشی خاص فراهم می‌کند. این مطالعه نشان

1- gut barrier function

می‌دهد که سویه‌ها باید بر اساس کاربرد مورد نظرشان انتخاب شوند، زیرا اختصاصیت عمل یک سویه خاص ممکن است بسیار بالا باشد. انتخاب پروبیوتیک‌هایی که یک پاتوژن خاص را مهار یا جابجا می کنند، رویکرد منطقی برای پیشگیری یا درمان عفونت ناشی از آن پاتوژن خواهد بود. با این حال، باید در نظر گرفت که مطالعات *درون تنی* برای تأیید چنین تأثیرات بالقوه ای ضروری است.

نتیجه‌گیری

سویه‌های لاکتیک اسید باکتری با توانایی قابل قبول برای چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال می‌توانند برای استقرار در روده مناسب باشند. آنها می‌توانند به عنوان مانعی برای مبارزه با پاتوژن‌ها از طریق مکانیسم‌های رقابتی مختلف، مانند هم انبوهش با پاتوژن‌ها و چسبندگی عمل کنند. سویه M17 پروفایل ایمنی و ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی دارد زیرا فعالیت تداخلی قابل قبولی در مقابل تهاجم *کرونوباکتر ساکازاکی* نشان می‌دهد.

منابع

1. Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., & Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT—Food Science and Technology*, *79*, 316–325. http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.lwt.2017.01.041
2. Agostoni, C., Axelsson, I., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Puntis, J.W.L., Rigo, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D., Vandenplas, Y., & Weaver, L.T. (2004). Preparation and handling of powdered infant formula: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *39*, 320–322. https://doi.org/10.1097/00005176-200410000-00002
3. Arboleya, S., González, S., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G., & Gueimonde, M. (2012). Development of probiotic products for nutritional requirements of specific human populations. *Engineering in Life Sciences*, *12*, 368–376. https://doi.org/10.1002%2Felsc.201100129
4. Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (2012). Essential Amino Acids. *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*. Boca Raton: CRC press.
5. Azizi, F., Habibi Najafi, M.B., & Edalatian Dovom, M.R. (2017). The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Expr*, *7*, 176. https://doi.org/10.1186/s13568-017-0474-2
6. Bacha, K., Mehari, T., & Ashenafi, M. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from Wakalim, a traditional Ethiopian fermented sausage. *Journal of Food Safety*, 30, 213–223. http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00201.x
7. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., & Brooks, H.L. (Eds.). (2018). *Ganong's Review of Medical Physiology, 25e*. McGraw Hill.
8. Bassyouni, R.H., Abdel-All, W. S., Fadl, M.G., Abdel-All, S., & Kamel, Z. (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. *Life Science Journal*, *9*, 2924–2933.
9. Bengoa, A.A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S.A., Bronsoms, S., Serradell, M.L.Á., Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International*, *103*, 462-467. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.093
10. Blackburn, S. (2016). *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*. Saunders Elsevier.
11. Botes, M., Van Reenen, C.A., L. & Dicks, M.T. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology*, *128*, 362–370. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.016
12. Bover-Cid, S., & Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *53*, 33–41. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00152-x
13. Bowen, A.B., & Braden, C.R. (2006). Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging Infectious Diseases*, *12*, 1185-1189. http://dx.doi.org/10.3201/eid1208.051509
14. Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W., & Newman, S.M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Society for Experimental Biology and Medicine*, *214*(3). https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093
15. Byakika, S., Mukisa, I.M., Byenkya, Y., & Muyanja, C. (2020). Probiotic potential of lactic acid starter cultures isolated from a traditional fermented sorghum-millet beverage. *International Journal of Microbiology*, https://doi.org/10.1155/2020/7825943

16. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *292*, 315–322. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2006
17. Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain‑specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, *9*, 12. https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4
18. Cekola, P.L., Czerkies, L.A., Storm, H.M., Wang, M.H., Roberts, J., & Saavedra, J.M. (2015). Growth and tolerance of term infants fed formula with probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Clinical Pediatrics*, *54*(12), 1175-84. https://doi.org/10.1177/0009922815574076
19. Charchoghlyan, H., Kwon, H., Hwang, D.J., Lee, J.S., Lee, J., & Kim, M. (2016). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er2 317/402. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *36*(5), 635-640. https://doi.org/10.5851%2Fkosfa.2016.36.5.635
20. Chou L.S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, *82*, 23–31. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75204-5
21. CODEX Alimentarius Commission. (2008). *Cac/rcp 66-2008 Code of Hygienic Practice for Powdered Infant Formula for Infants and Young Children*. Joint FAO/WHO food standards programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
22. Collado, M.C., Isolauri, E., & Salminen, S. (2008a). Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, *285*, 58–64. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01211.x
23. Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(4), 454-60. https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02212.x
24. Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008b). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research* and *Technology*, *226*, 1065–1073. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x
25. de Carvalho, K.G., Kruger, M.F., Furtado, D.N., Todorov, S.D., & de Melo Franco, B.D.G. (2009). Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic *in vitro* model. *Annals of Microbiology*, *59*(3), 439-445. https://doi.org/10.1007/BF03175128
26. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, *31*, 438-442. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x
27. Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., & Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clinical Infectious Diseases*, *42*, 996–1002. https://doi.org/10.1086/501019
28. Erickson, T., Ahrens, W.R., Aks, S., Baum, C., & Ling, L. (2005). *Pediatric Toxicology: Diagnosis and Management of the Poisoned Child*. New York: McGraw-Hill.
29. Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., & Suihko, M.L. (2001). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science*, *58*, 111–116. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(00)00135-2
30. European Food Safety Authority. (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antimicrobials of human or veterinary importance. *EFSA Journal*, *732*, 1–15. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.732
31. Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., & Zello, G.A. (2005). D-lactate in human and ruminant metabolism. *The Journal of Nutrition*, *135*(7), 1619-25. https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1619
32. FAO. (2007). *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
33. FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report on joint FAO/WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf?ua=1
34. FAO/WHO. (2006a). Expert meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy.
35. FAO/WHO. (2006b). Probiotics in food; Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, Italy.

36. Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., & Brenner, D.J. (1980). The Enterobacteriaceae study group *Enterobacter sakazakii:* A New Species of *"Enterobacteriaceae"* Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *30*, 569-584. https://doi.org/10.1099/00207713-30-3-569
37. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, *109*, 35–50. https://doi.org/10.1017/s0007114512004011
38. Food Safety Authority of Ireland. (2011). *Guidance Note No. 18: Validation of Product Shelf-Life* (Revision 1); Dublin, Ireland.
39. Grady Jr, C.L., Daigger, G.T., Love, N.G., & Filipe, C.D. (2011). *Biological Wastewater Treatment*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. https://doi.org/10.1201/b13775
40. Grodner, M., Escott-Stump, S., & Dorner, S. (2021). *Nutritional Foundations and Clinical Applications A Nursing Approac*h.
41. Guarner, F., & Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 237-238. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00136-0
42. Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., & Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, *104*, 1–34. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.013
43. Holý, O., & Forsythe, S. (2014). *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, *86*, 169-177. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.011
44. Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., & Franz, C.M.A.P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*, 730–739. https://doi.org/10.1128/aem.02105-06
45. Hunter, C.J., Williams, M., Petrosyan, M., Guner, Y., Mittal, R., Mock, D., Upperman, J.S., Ford, H.R., & Prasadarao, N.V. (2009). *Lactobacillus bulgaricus* prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxide both *in vitro* and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*, *77*(3), 1031-1043. https://doi.org/10.1128/iai.01192-08
46. Iranian National Standard No. 19459. (2014). *Probiotic microorganisms specifications and test methods*. Iranian Standards and Industrial Research Institute, Tehran.
47. Jose, N., Bunt, C., & Hussain, M. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, *3*, 198–212. https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198
48. Kaktcham, N.F., Zambou, F.M., El-Soda, T.M., & Choudhary, M.I. (2012). Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. *Scientia Pharmaceutica*, *80*, 189–203. https://doi.org/10.3797/scipharm.1107-12
49. Kent, R.M., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R.P. (2015). Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*, *7*, 1217-1244. https://doi.org/10.3390%2Fnu7021217
50. Kos, B., Suskovic, J., Goreta, J., & Matosic, S. (2000). Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, *38*, 121-127.
51. Lai, K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine*, *80*, 113-122. https://doi.org/10.1097/00005792-200103000-00004
52. Lee, Y.K., & Puong, K.Y. (2002). Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition*, *88*, 101–108. https://doi.org/10.1079/bjn2002635
53. Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, *3*, 84–92.
54. Liong, M.T., & Shah N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, *88*, 55–66. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72662-x
55. Liu, W., Chen, M., & Duo, L. (2020). Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. *Journal of Dairy Science*, *103*, 4013–4025. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17602
56. Mathara, J., Schillinger, U., & Guigas, C. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, *126*, 57–64. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.027
57. Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, *105*, 281–295. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008

58. Mohan Nair, M.K., Venkitanarayanan, K., Silbart, L.K., & Kim, K.S. (2009). Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* Binds Fibronectin and Contributes to Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Foodborne Pathogens and Disease*, *6*(4), 495-501. https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0228
59. Møller, C.O.A., Ücok, E.F., & Rattray, F.P. (2020). Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese. *Food Research International*, *128*, 108719. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108719
60. Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J.M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M.J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D., & Gil, A. (2013). Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British Journal of Nutrition*, *109*, S51–S62. https://doi.org/10.1017/s0007114512005211
61. Nazarowec-White, M., & Farber, J.M. (1997). *Enterobacter sakazakii*: A review. *International Journal of Food Microbiology*, *34*, 103-113. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01172-5
62. Olasupo, N.A., Schillinger, U., & Holzapfel, W.H. (2001). Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. *Food Biotechnology*, *15*(3), 157-167. http://dx.doi.org/10.1081/FBT-100107627
63. Özogul, F., & Özogul, Y. (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*, *225*, 385-394. http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0429-3
64. Pagotto, F.J., & Farber, J.M. (2009). *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, *136*, 238-245. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.010
65. Papagaroufalis, K., Fotiou, A., Egli, D., Tran, L.A., & Steenhout, P. (2014). A randomized double blind controlled safety trial evaluating D-lactic acid production in healthy infants fed a *Lactobacillus reuteri*-containing formula. *Nutrition and Metabolic Insights*, *7*, 19-27. https://doi.org/10.4137/nmi.s14113
66. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, *65*, 859–867. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00292-9
67. Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T. & San Romao, M.V. (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*, *68*, 211–216. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00534-7
68. Pérez Martínez, G., Bäuerl, C., & Amores, M.C.C. (2012). *Selection and evaluation of probiotics*. In L. M. L. Nollet and F. Toldrá eds. Handbook of analysis of active compounds in functional foods. CRC Press; Taylor & Francis Group.
69. Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., & Lo Nostro, A. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*, *41*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.008
70. Pianpumepong, P. & Noomhorm, A. (2010). Isolation of probiotic bacteria from turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and its application in enriched beverages. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*, 2456–2462. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02337.x
71. Połka, J., Morelli, L., & Patrone, V. (2016). Microbiological cutoff values: A critical issue in phenotypic antibiotic resistance assessment of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Microbial Drug Resistance, 24, 345-370.* https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0328
72. Priyadarshani, W.M.D., & Rakshit, S.K. (2011). Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science & Technology*, *46*, 2062–2069. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x
73. Radulović, Z., Petrović, T., & Bulajić, S. (2012). Antibiotic susceptibility of probiotic bacteria. http://cdn.intechopen.com/pdfs/34710/InTechAntibiotic_susceptibility_of_probiotic_bacteria.pdf
74. Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, M.C., Fernández, M., & Alvarez, M.A. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*, *139*(1-4), 1029-35. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071
75. Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R., & Cook, R.L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, *34*, 344–351. https://doi.org/10.1139/m88-063
76. Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Casquete, R., Serradilla, M.J., & Córdoba, M.d.G. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, *83*, 460–467. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.027

77. Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., & Tompkins, T.A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic E. coli O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity*, *73*, 5183–5188. https://doi.org/10.1128/iai.73.8.5183-5188.2005
78. Singhal, K., Joshi, H., & Chaudhary B.L. (2010). Bile and acid tolerance ability of probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Global Pharma Technology*, *2*, 17–25.
79. Srimahaeak, T., Bianchi, F., Chlumsky, O., Larsen, N., & Jespersen, L. (2021). *In-vitro* study of *Limosilactobacillus fermentum* PCC adhesion to and integrity of the Caco-2 cell monolayers as affected by pectins. *Journal of Functional Foods*, 79. https://doi.org/104395.10.1016/j.jff.2021.104395
80. Tomás, M.S.J., Wiese, B., & Nader-Macías, M.E. (2005). Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of Applied Microbiology*, *99*, 1383–1391. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02726.x
81. Tomáška, M., Drončovský, M., Klapáčová, L., Slottová, A., & Kološta, M. (2015). Potential probiotic properties of Lactobacilli isolated from goat´s milk. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, *9*(1), 66–71. https://doi.org/10.5219/434
82. Veerappan, G.R., Betteridge, J., & Young, P.E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, *14*, 324–333. https://doi.org/10.1007/s11894-012-0265-5
83. Vitetta, L., Coulson, S., Thomsen, M., Nguyen, T., & Hall, S. (2017). Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. *Gut Microbes*, *4*, 311-322. https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279379